

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2003 年 10 月 16 日 (16.10.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/085100 A1(51) 国際特許分類⁷: C12N 5/08 // (C12N 5/08, C12R 1:91)

(21) 国際出願番号: PCT/JP02/03398

(22) 国際出願日: 2002 年 4 月 4 日 (04.04.2002)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 第一化学薬品株式会社 (DAIICHI PURE CHEMICALS CO., LTD.) [JP/JP]; 〒103-0027 東京都中央区日本橋3丁目13番5号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 島田 典招 (SHIMADA, Noriaki) [JP/JP]; 〒319-1112 茨城県那珂郡東海村村松2117 第一化学薬品株式会社内 Ibaraki (JP).
モウレル パトリック (MAUREL, Patrick) [FR/FR]; F-34293 セデックス 05, モンペリエ, サイトドシーエヌアールエス 1919 ルートドメンドアイエフアール 24 Cedex (FR).

(74) 代理人: 特許業務法人アルガ特許事務所 (THE PATENT CORPORATE BODY ARUGA PATENT OFFICE); 〒103-0013 東京都中央区日本橋人形町1丁目3番6号共同ビル Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF CULTURING LIVER CELLS OVER LONG TIME

(54) 発明の名称: 肝細胞の長期間培養法

(57) Abstract: A method of culturing liver cells over a long time characterized in that fresh liver cells are maintained in a medium at a temperature of 15 to 30 °C for 1 to 6 days and then cultured. According to the above method, liver cells can be cultured over a long time without losing the enzymatic activity or the enzyme-inducing activity thereof. This method is particularly useful in transporting extirpated liver cells over a long period of time, since the liver cells can be maintained at around room temperature for 1 to 6 days therein.

(57) 要約: 新鮮肝細胞を培地中 15 ~ 30 °C の温度に 1 ~ 6 日間保持した後生理的条件で培養することを特徴とする肝細胞の長期間培養法。本発明方法によれば、肝細胞の酵素活性及び酵素誘導活性を失うことなく長期間培養できる。また、室温付近に 1 ~ 6 日間保持できるので、肝細胞摘出後の長時間輸送する場合に特に有用である。

BEST AVAILABLE COPY

明 細 書

肝細胞の長期間培養法

技術分野

本発明は、新鮮肝細胞を各種酵素活性又は各種酵素誘導活性を失わずに長期間培養するための方法に関する。

背景技術

肝細胞は、アルブミンの他、チトクローム P450 (CYP) ファミリーの各種薬物代謝酵素、 α 1-アンチトリプシン等の凝固線溶系酵素等を産生しているため、摘出された新鮮肝細胞の培養物は、これらの酵素活性測定用細胞として広く使用されている。

通常肝細胞は摘出後酵素の失活を防止する目的で4℃以下に冷却保存し、その後約37℃に戻して長期間培養し、各種試験に用いられている。

近年、肝細胞の入手が困難になってきていることから、得られた肝細胞を長期間保存したり、長距離、例えば国際間輸送する必要性が生じてきた。そのためには、新鮮肝細胞を少なくとも2日以上にわたり各種酵素活性又は酵素誘導活性を失わずに保存することが必要になってきた。

しかし、従来の4℃以下の低温保存方法では、2日以上保存すると、通常30～60%の酵素あるいは酵素誘導活性が失活してしまい、正確な測定ができなかった。

従って、本発明の目的は、肝細胞を、酵素活性や酵素誘導活性を失わせることなく長期間培養する方法を提供することにある。

発明の開示

そこで本発明者は、新鮮肝細胞の長期間培養条件について種々検討したところ、

従来の低温（４℃）保存に代えて生理的条件である約３７℃で保存しても肝細胞の酵素活性や酵素誘導活性はある程度保持されるが、全く意外にも１５～３０℃の室温条件で１～６日間保存した後、生理的条件に戻して培養すると、当該３７℃保存よりもさらに高い酵素活性や酵素誘導活性が保持され、長期間安定であり、長距離輸送した後も薬物代謝酵素誘導試験等が正確に実施できることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、新鮮肝細胞を培地中１５～３０℃の温度に１～６日間保持した後生理的条件下で培養することを特徴とする肝細胞の長期間培養法を提供するものである。

図面の簡単な説明

図１は、各種条件にて４８時間保存して培養した後のサル肝細胞の尿素合成能を示す図である。

図２は、２５℃４８時間保存して培養した後のサル肝細胞の α １-アンチトリプシン合成能を示す図である。

図３は、２５℃９６時間保存して培養した後のサル肝細胞の α １-アンチトリプシン合成能を示す図である。

図４は、２５℃４８時間保存して培養した後のサルの肝細胞の CYP3A4 誘導能を示す図である（RIF はリファンピシン暴露、UT は未暴露）。

図５は、２５℃４８時間保存して培養した後のヒト肝細胞の尿素合成能を示す図である。

図６は、２５℃９６時間保存して培養した後のヒト肝細胞の尿素合成能を示す図である。

図７は、２５℃１４４時間保存して培養した後のヒト肝細胞の尿素合成能を示す図である。

図８は、２５℃９６時間保存して培養した後のヒト肝細胞のアルブミン合成能

を示す図である。

図 9 は、25℃ 96 時間保存して培養した後のヒト肝細胞の $\alpha 1$ -アンチトリプシン合成能を示す図である。

図 10 は、25℃ 48、96 又は 144 時間保存して培養した後のヒト肝細胞の CYP3A4 誘導能を示す図である (RIF はリファンピシン暴露、UT は未暴露)。

発明を実施するための最良の形態

本発明方法に用いられる肝細胞は、摘出後継代培養を行っていない新鮮肝細胞であり、すなわち初代培養肝細胞である。肝細胞としては、哺乳類肝細胞、さらに霊長類肝細胞、特にヒト肝細胞が好ましい。

本発明においては、新鮮肝細胞を培地中で 15～30℃ に 1～6 日間保持することが必要である。15℃ 未満、例えば従来の保存温度である 4℃ では肝細胞の酵素活性及び酵素誘導活性が低下する。また、30℃ を超える温度、例えば生理的条件である約 37℃ でも肝細胞の酵素活性及び酵素誘導活性は 15～30℃ 保存の場合よりも低くなる。好ましい保持温度は 18～27℃ であり、より好ましくは 20～25℃ である。

本発明に用いられる新鮮肝細胞の培地は、通常の動物細胞用の培地であればよいが、ランフォード (Lanford) 培地、ウィリアムズ E (WME) 培地、Isom 培地、Leibovitz L15 培地、ポリエチレングリコール添加 Leibovitz L15 培地、及びこれらを組み合わせた培地等が挙げられるが、少なくともランフォード培地を含む培地が特に好ましい。

新鮮肝細胞用の培地中の肝細胞の濃度は、 $0.5 \times 10^6 \sim 1.0 \times 10^6$ cell/mL、特に $1 \times 10^6 \sim 1.0 \times 10^6$ cell/mL が好ましい。

15～30℃ に保持する期間は 1～6 日間、特に 2～6 日間が好ましい。

15～30℃ に 1～6 日間保持した後、肝細胞は生理的条件下で培養すればよい。生理的条件下の培養としては、通常の培地中 37 ± 1℃ の培養が好ましい。ここで

培地としては、通常の動物細胞の培養に用いられる培地であればよいが、前記新鮮肝細胞の培地と同じものが好ましく、特に少なくともランフォード培地を含む培地が好ましい。

このような生理的条件の培養を継続すれば、肝細胞は1ヶ月以上もの長期間に渡り、酵素活性及び酵素誘導活性が失われず、各種酵素活性の測定、薬物代謝酵素誘導活性の測定を正確に行うことができる。ここで、測定できる酵素活性としては、 α 1-アンチトリプシン活性、グルタミン-S-トランスフェラーゼ (GST)、GOT、GPT、尿素合成能、アルブミン合成能等が挙げられる。また酵素誘導活性としては、CYPファミリー、例えば CYP1A1、CYP1A2、CYP2A6、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2E6、CYP3A4 等が挙げられる。

肝細胞、特にヒト肝細胞の入手は困難であり、肝細胞の摘出場所と各種試験場所とが離れている場合、特にそれらの場所が国際間の場合、肝細胞の輸送には通常2日間以上必要である。本発明方法は、このような長距離輸送後に試験を行う場合に特に有用である。

実施例

次に実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明するが、本発明は何らこれに限定されるものではない。

A. 材料及び方法

(1) 肝細胞の初代培養

ヒト肝臓は、4名の患者から摘出されたものを用いた。サルの肝臓は、若い雄ザルの肝臓を用いた。

ヒト肝細胞を公知の方法 (Drug Metab. Dispos. 18:595-606(1990)、Mol. Pharmacol. 41:1047-1055(1992)、J. Pharmacol. Exp. Ther. 269:384-392(1994))に従い、葉摘手術されたものを培養した。播種前の細胞の生存はトリパンプルー排除試験を用いて確認したところ、80～90%であった。肝細胞は、

コラーゲン I ($5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) で被覆した組織培養フラスコ (25 cm^2) 中の Isom 培地に、コンフルエント (1.2×10^4 個/ cm^2) になるように播種した。培地は Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 81:6378-6382(1984) 記載のように Ham F12 及びウィリアムズ E の混合物 (1 : 1) を用いた。細胞播種後最初の 4 時間は細胞の付着を目的として 5 % 仔牛血清を添加した。肝細胞播種 4 時間後に仔牛血清添加標準培地を除去し、ランフォード培地を添加した。このように培養 1 日目に培地を変換した後、肝細胞培養物を湿度が高く、5 % CO_2 、37℃ 条件下に 3 又は 4 日間保持した。こうして肝細胞培養系を 1 度確立した時点でランフォード培地を吸引除去し、フラスコを 5 % CO_2 で平衡化した 95 % 空気と、ランフォード培地 (「Lnf」と略す)、5 % ポリエチレングリコール添加 Leibovitz L15 (シグマ社) 培地 (「L15+5%PEG」と略す)、又は Isom 培地 (37℃) で満たし、氷冷条件又は室温条件に 2、4 又は 6 日間保持した。その後、肝細胞含有フラスコを長期間培養のために 37℃ で Lnf にもどした。肝細胞の生存及び機能に及ぼす、培地、温度及び保存期間の影響について、各培地変換後 24 時間ごとに採取した細胞の種々の表現型、すなわち、尿素合成能 (酵素/分光光学的分析による)、並びに α 1-アンチトリプシン及びアルブミン合成能 (ウェスタンブロットによる) を測定した。得られた結果は初期値及びコントロール群 (試験期間中、Lnf 中 37℃ に保持した群) と比較して示した。さらに、肝特異的表現型が維持されているか否かの最もよい指標であり、医薬品開発における薬物相互作用を予測する上で重要なチトクローム P450 酵素の誘導に対する細胞の反応 (リファンピシンによる CYP3A4 の誘導) を検討した。

(2) 培地組成

用いた培地の組成を表 1、表 2 及び表 3 に示す。

表 1

ランフォード培地 (Lnf)

0.5 mg/mL	B S A
1 μ M	ハイドロコチゾン
10 μ g/mL	インスリン
50 ng/mL	表皮増殖因子 (EGF)
2 μ g/mL	グルカゴン
5 μ g/mL	リノレン酸
0.1 μ M	酢酸セレンウム
2 ng/mL	コレラトキシン
20 ng/mL	肝細胞増殖因子
5 μ g/mL	トランスフェリン
1 μ M	エタノールアミン
100 ng/mL	プロラクチン
100 U/mL	ペニシリン
100 μ g/mL	ストレプトマイシン
25 μ g/mL	ファンギゾン

表 2

L15 + 5 % PEG

シグマ社製 Leibovitz L15	
5 % ポリエチレングリコール	
Leibovitz L15	(mg/L)
無機塩	
CaCl ₂	140
KCl	400
KH ₂ PO ₄	60
MgCl ₂	94
MgSO ₄	8000
NaCl	190
Na ₂ HPO ₄	
他の成分	
D(+)ガラクトース	900
フェノールレッド	10
ビルビン酸Na	550
アミノ酸	
L-アラニン	225
L-アルギニン	500
L-アスパラギン	250
L-システイン	120
L-グルタミン	300
グリシン	200
L-ヒスチジン	250
L-イソロイシン	250
L-ロイシン	125
L-リジン	75
L-メチオニン	75
L-フェニルアラニン	125
L-セリン	200
L-スレオニン	300
L-トリプトファン	20
L-チロシン	300
L-バリン	100
ビタミン類	
D-パントテン酸Ca	1
コリンクロリド	1
葉酸	1
イノシトール	2
ナイアミンアミド	1
ピリドキシンHCl	1
リボフラビン-5-ホスフェート 2H ₂ O	0.1
チアミンモノホスフェート	1

表 3

Isom培地	
2. 4 mM	グルタミン
0. 1 μ M	デキサメタゾン (DEX)
2 μ g/mL	インスリン
50 μ g/mL	トランスフェリン
3. 6 μ M	リノレン酸
66. 8 μ M	エタノールアミン
0. 4 mM	ピルビン酸Na
250 μ M	アスコルビン酸
100 U/mL	ペニシリン
100 μ g/mL	ストレプトマイシン
25 μ g/mL	ファレギゾン
0. 5 μ M	フルコナゾール

(3) ライセートの調製

ライセートは、公知の方法で遠心分離により培養細胞から調製し保存した。蛋白濃度はピシンコニン酸法（ピエルス ケミカル社）で測定した。

(4) 培養肝細胞の細胞外培地中の血清タンパクの定量化

細胞外培養培地（5～20 μ L 培地）中のアルブミン及び α 1-アンチトリプシンの定量化は、ヒト蛋白に対する特異抗体を用いたウェスタンブロット法を用いて行った。培地サンプルを2個のフラスコから採取し、混合し、11000 \times gで5分間遠心分離し、分析まで-80℃で保存した。

(5) 培養肝細胞中の CYP の定量化

Hepatology 22:1143-1153(1995)に従い、特異的ポリクローナル又はモノクローナル抗体を使用してライセートのイムノブロット法により定量化した。遺伝子発現した CYP2C9、CYP2C19 又は CYP3A4（ジェンテスト社）を含むミクロソームを各ゲルのスタンダードとして使用した。

ライセートはニトロセルロース膜に転写する前に SDS 10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動に付した。プロットはアマシャム社の ECL（エンハンスケミルミ

ネセンス)を用いて展開した。CYP の相対量をアドブフォトショップ LE プログラムでプロットのスキヤニングし、NIH イメージ 1.6/ppc プログラムを用いてイメージの定量分析して計算した。

(6) 培養肝細胞の細胞外培地中の尿素合成能

尿素合成能はシグマ社の酵素/分光光学的アッセイキットにより測定した。

B. 結果

(1) 尿素合成能に対する保存温度条件の効果

サル肝細胞を、Lnf 又は L-15 + 5 %PEG 培地中で 2 日間、0℃又は 25℃で保存した後、37℃Lnf 培地で培養した後(1日後、2日後、3日後、8日後及び 11日後)のサル肝細胞の尿素合成能を図 1 に示す。図 1 から明らかなように、Lnf 培地中、37℃で保存後培養したコントロール群に比べて、0℃保存後培養した群では、Lnf 及び L-15 + 5 %PEG 培地いずれの培地を用いた場合も尿素合成能は低下していた。これに対し、25℃保存後培養した群ではコントロール群に比べ Lnf 培地中でも L-15 + 5 %PEG 培地中でも尿素合成能は高く維持されていた。L-15 + 5 %PEG 培地に比べて Lnf 培地がより優れていた。

(2) α 1-アンチトリプシン合成能及び CYP3A4 誘導能

サル肝細胞を、Lnf 又は L-15 + 5 %PEG 培地中 25℃で 2 日間(48時間)又は 4 日間(96時間)、保存した後、Lnf 培地中 37℃で培養した後の α 1-アンチトリプシン合成能を図 2 及び図 3 に示す。図 2 及び図 3 は、最初から 37℃で保存、培養した場合のデータとの相対値で示す。

図 2 及び図 3 から明らかなように、2 日又は 4 日間 25℃で保存後培養した場合には、最初から 37℃で保存・培養した場合に比べて、培養期間 8 ~ 15 日では、 α 1-アンチトリプシン合成能が高く維持されていた。

またサル肝細胞を、Lnf 又は L-15 + 5 %PEG 培地中 25℃で 2 日間(48時間)、保存した後、Lnf 培地中 37℃で培養した後の CYP3A4 誘導能を図 4 に示す。図 4 には最初から 37℃で保存・培養した場合のデータの相対値も示す。

図4から明らかなように、25℃で2日間保存した後培養した場合には、最初から37℃で保存・培養した場合（1.8倍）に比べて、10～14日培養後に強いCYP3A4誘導能（2.3倍、2.4倍）を有していた。

（3）尿素合成能に対する効果（ヒト肝細胞）

ヒト肝細胞を、Lnf又はIsom培地中25℃で2、4又は6日間保存した後Lnf培地中37℃で培養した後の尿素合成能を図5、6及び7に示す。

図5、6及び7から明らかなように、最初から37℃で保存・培養したコントロールに比べ、Lnf培地及びIsom培地中25℃で2、4又は6日間保存後培養した場合は、強い尿素合成能を有していた。

（4）アルブミン合成能及び α 1-アンチトリプシン合成能（ヒト肝細胞）

ヒト肝細胞をLnf又はIsom培地中25℃で4日間保存した後Lnf培地中37℃で培養した後のアルブミン合成能及び α 1-アンチトリプシン合成能を図8及び図9にそれぞれ示す。

図8及び図9から明らかなように、最初から37℃で保存・培養したコントロールに比べ、4日間25℃で保存後培養した場合は、強いアルブミン合成能及び α 1-アンチトリプシン合成能を有していた。

（5）CYP3A4誘導能（ヒト肝細胞）

ヒト肝細胞を、Lnf又はL-15+5%PEG培地中25℃で2、4又は6日間保存した後、Lnf培地中37℃で培養した後のCYP3A4誘導能を図10に示す。

図10から明らかなように、最初から37℃で保存・培養したコントロールに比べ、Lnf又はL-15+5%PEG培地中25℃で2、4又は6日間保存後培養した場合は、強いCYP3A4誘導能を有していた。

産業上の利用可能性

本発明方法によれば、肝細胞の酵素活性及び酵素誘導活性を失うことなく長期間培養できる。また、室温付近に1～6日間保持できるので、肝細胞摘出後の長

時間輸送する場合に特に有用である。

請求の範囲

1. 新鮮肝細胞を培地中 $15 \sim 30^{\circ}\text{C}$ の温度に 1 ～ 6 日間保持した後生理的条件下で培養することを特徴とする肝細胞の長期間培養法。
2. 新鮮肝細胞の培地が、少なくともランフォード培地を含む培地である請求項 1 記載の肝細胞の長期間培養法。
3. 生理的条件下の培養が、 $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ で、少なくともランフォード培地を含む培地中の培養である請求項 1 又は 2 記載の肝細胞の長期間培養法。

図 1

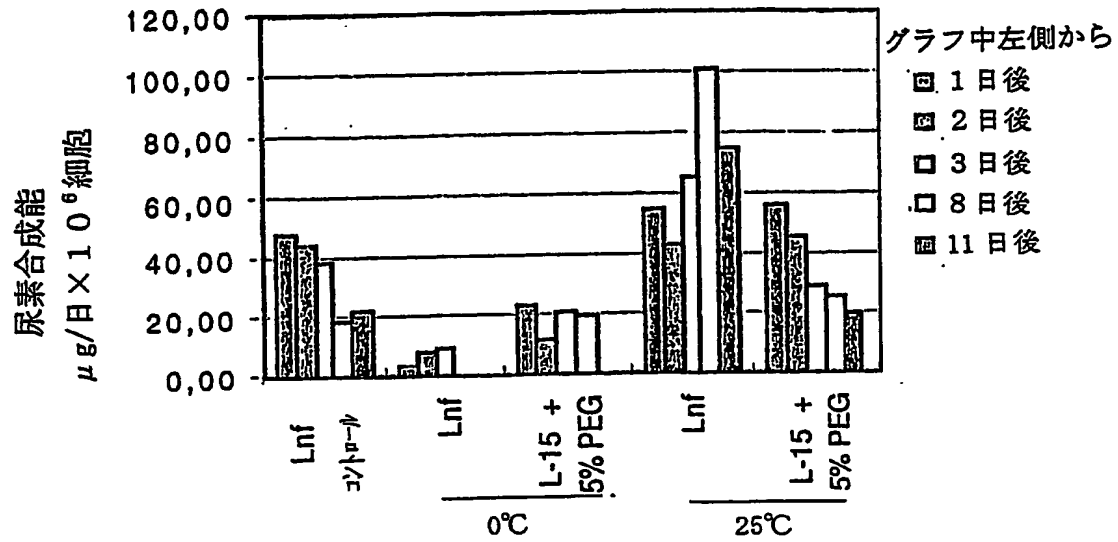


図 2

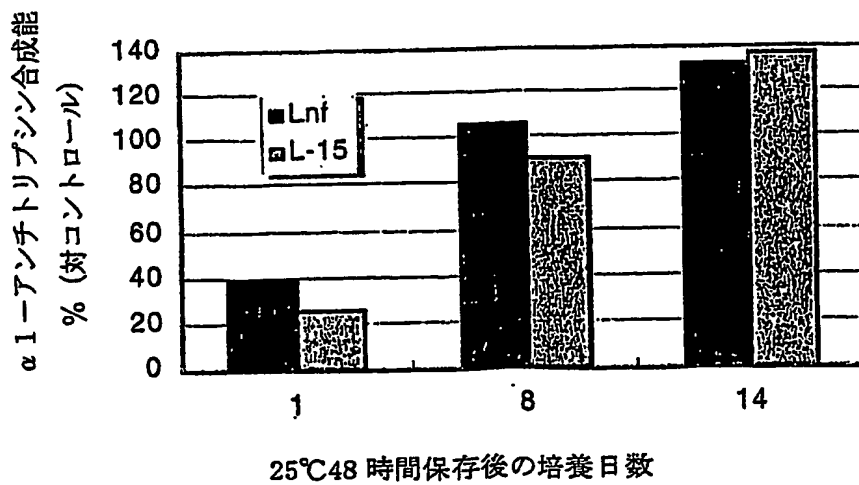


図 3

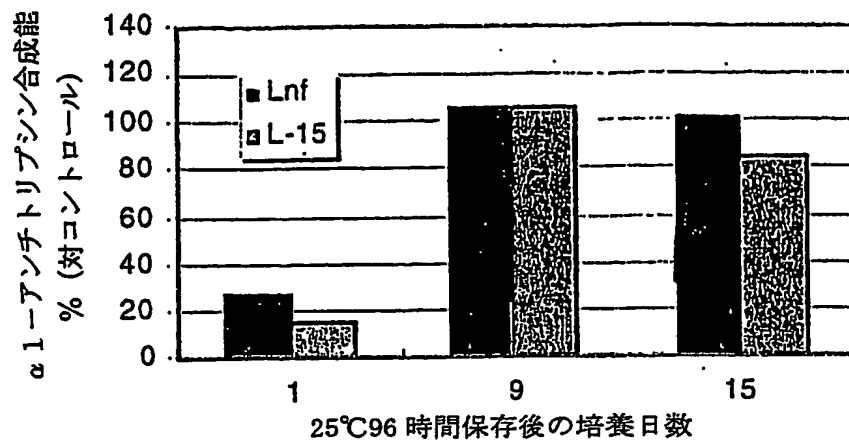


図 4

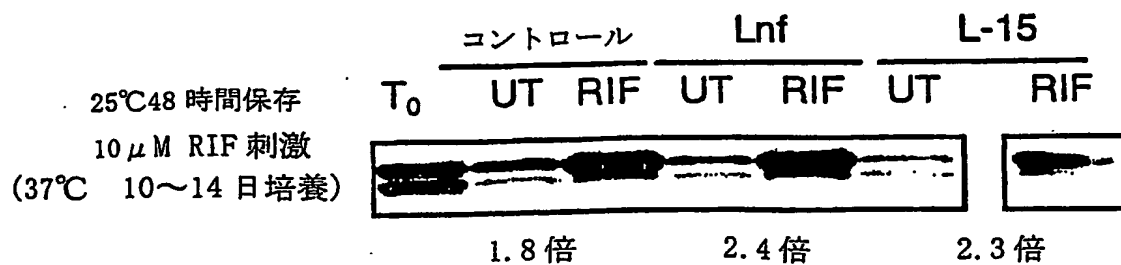


図 5

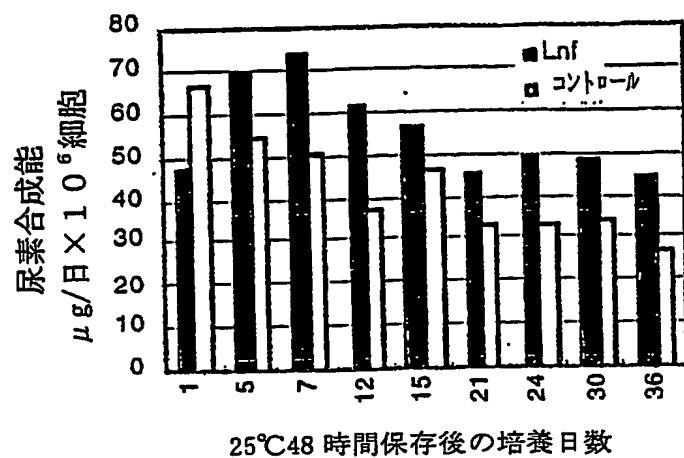


図 6

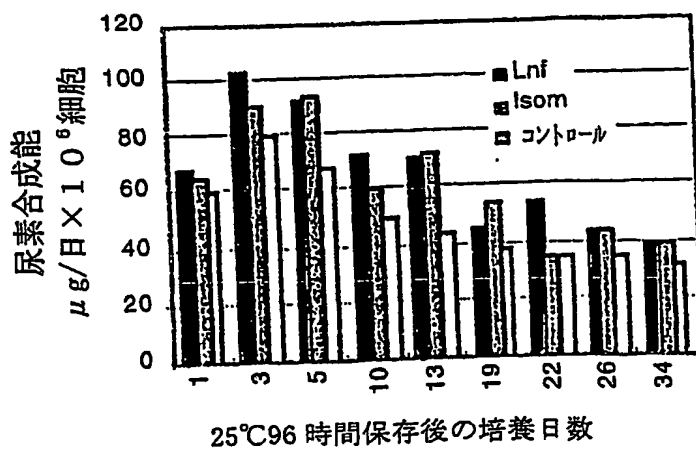


図 7

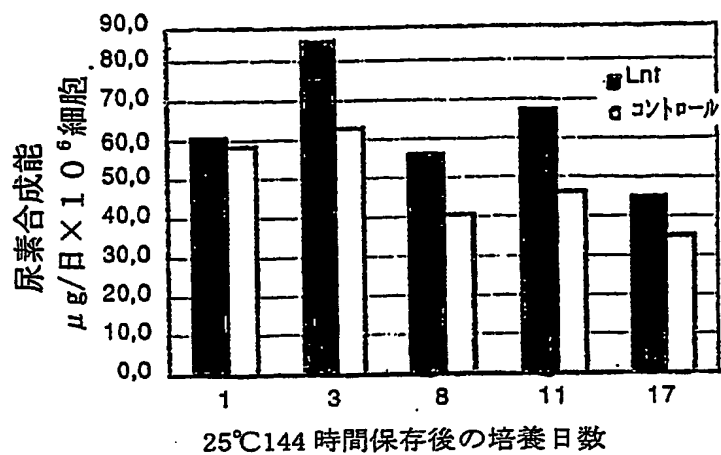


図 8

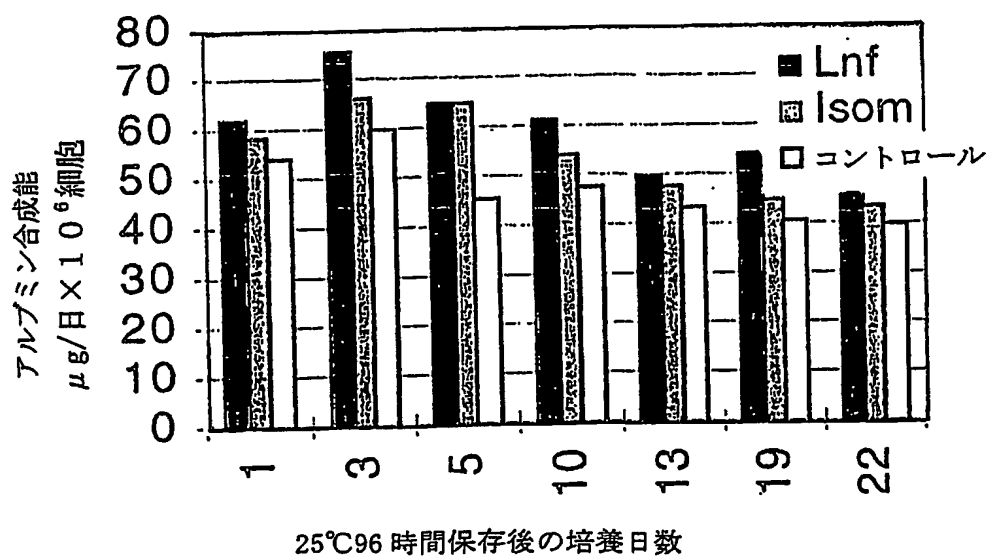


図 9

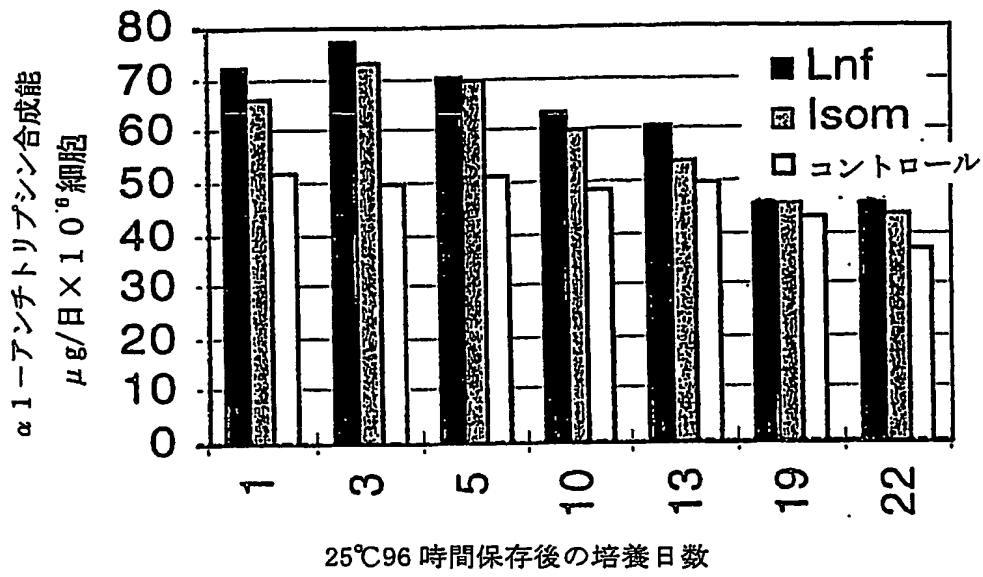
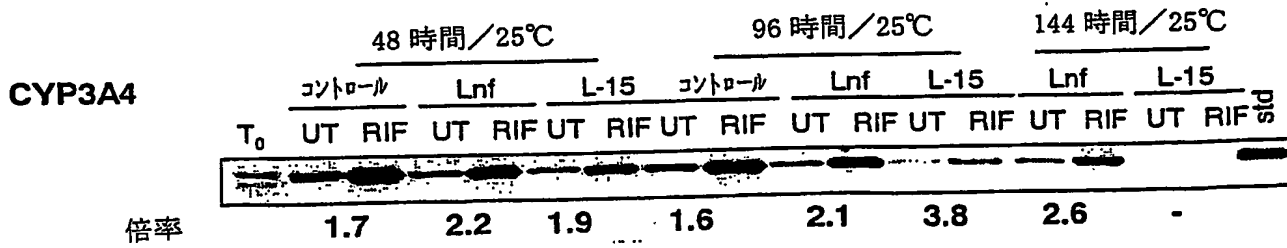


図 10



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/03398

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N5/08// (C12N5/08, C12R1:91)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N5/00-5/28

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSYS (DIALOG), JICST FILE (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> A	JP 8-9966 A (Sumitomo Bakelite Co., Ltd.), 16 January, 1996 (16.01.96), (Family: none)	<u>1</u> 2-3
A	JP 56-29992 A (Nikkiso Co., Ltd.), 25 March, 1981 (25.03.81), (Family: none)	1-3

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
30 April, 2002 (30.04.02)Date of mailing of the international search report
21 May, 2002 (21.05.02)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12N 5/08 //(C12N 5/08, C12R 1:91)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12N 5/00-5/28

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSYS (DIALOG), JICSTファイル (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> A	JP 8-9966 A (住友ベークライト株式会社) 1996. 01. 16 (ファミリーなし)	<u>1</u> 2-3
A	JP 56-29992 A (日機装株式会社) 1981. 03. 25 (ファミリーなし)	1-3

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

30. 04. 02

国際調査報告の発送日

21.05.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鈴木 恵理子

4N

2937

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.